На правах рукописи

СИМОНОВ
Евгений Петрович

СТРУКТУРА И ДИНАМИКА ПЕРИФЕРИЙНОЙ ПОПУЛЯЦИИ ОБЫКНОВЕННОГО ЩИТОМОРДНИКА (*GLOYDIUS HALYS*)

03.02.04 – зоология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Новосибирск – 2012

Работа выполнена в лаборатории экологии сообществ позвоночных животных Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института систематики и экологии животных СО РАН

Научный руководитель:	доктор биологических наук, Литвинов Юрий Нарциссович (Институт систематики и экологии животных СО РАН, г. Новосибирск, заместитель директора по научной работе)
Научный консультант:	кандидат биологических наук, Ермаков Олег Александрович (Пензенский ГУ, г. Пенза, доцент)
Официальные оппоненты:	доктор биологических наук, Графодатский Александр Сергеевич (Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск, заместитель директора по научной работе)
	кандидат биологических наук, Литвинчук Спартак Николаевич (Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург, с.н.с.)
Ведущее учреждение:	Национальный исследовательский Томский государственный университет

Защита состоится 14 декабря в 14 часов на заседании диссертационного совета Д 003.033.01 при Институте систематики и экологии животных СО РАН по адресу: 630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, 11. Факс: (383)2170-09-73, e-mail: dis@eco.nsc.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института систематики и экологии животных СО РАН.

Автореферат разослан _ ноября 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук Л.В. Петрожицкая

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследований. Одной из фундаментальных задач современной эволюционной биологии и популяционной экологии является изучение популяционной структуры видов [Яблоков, 1987; Struve et al., 2010]. Особый интерес в этом плане представляет исследование периферических популяций и популяций, занимающих естественно фрагментированные местообитания, а также выяснение механизмов, поддерживающих их длительное существование. Периферические популяции животных часто могут иметь эколого-морфологические особенности, отличные от таковых в популяциях из центральных частей ареала, что связано с существованием вида в неоптимальных абиотических и биотических условиях и формированием в связи с этим небольших по размерам и численности локальных популяций. Это, в свою очередь, ведёт к характерному изменению внутри- и межпопуляционной изменчивости [Ивантер, 2007].

Структура и динамика популяций пресмыкающихся, а в особенности змей, изучены весьма слабо. Проведение таких исследований, в случае со змеями, осложняется отсутствием у большинства видов чёткой популяционной структуры, низкой плотностью поселений и скрытным образом жизни [Sun et al. 2001]. Популяция обыкновенного щитомордника (*Gloydius halys* (Pallas, 1776)) на территории Новосибирской области представляет собой изолят на северной границе ареала данного вида. Змеи обладают здесь высокой плотностью на небольшой территории и отличаются относительной простотой для визуальных учётов и отловов для изучения морфологии, экологии и популяционной генетики. В связи с этим данная популяция может выступать в качестве модельного объекта, представляющего собой редкую возможность для детального изучения популяционной экологии змей.

Основными показателями, отражающими структуру популяции, являются её численность и распределение особей в пространстве, соотношение групп по полу и возрасту, их морфологические и генетические особенности. Что, в свою очередь, предполагает необходимость комплексного подхода при выявлении структуры популяции, основанного на изучении экологии, анализе морфологической и генетической изменчивости вида.

Цель работы - выявление характера морфологической и генетической дифференциации и степени связи между локальными популяциями щитомордника обыкновенного в естественно фрагментированных местообитаниях на северной периферии ареала (Новосибирская область).

Задачи:

1. выявить особенности биотопического распределения и пространственную структуру местообитаний щитомордника обыкновенного в исследуемой популяции;
2. на основании анализа изменчивости морфологических признаков выявить степень отличий между локальными популяциями;
3. изучить и сравнить половозрастную структуру и основные демографические показатели вида в разных локальных популяциях;
4. определить уровень генетического разнообразия и степень генетической дифференциации локальных популяций;
5. оценить степень обмена особями (скорость миграции) между локальными популяциями через интенсивность и направление потока генов между ними.

Научная новизна. Впервые исследованы особенности структуры и динамики популяции змей в условиях юга Западной Сибири с использованием комплексного подхода, включающего морфологические, экологические и генетические исследования. Впервые для обыкновенного щитомордника выявлены уровни миграции между локальными популяциями, показано преимущественно расселение вида за счет перемещений самцов. Установлено существование двух форм обыкновенного щитомордника, как минимум подвидового ранга, на юге Западной Сибири.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные в ходе исследования результаты вносят вклад в понимание структуры и динамики популяций пресмыкающихся и в познание механизмов, поддерживающих долговременное существование локальных популяций в условиях естественно фрагментированных ландшафтов. Важное практическое значение работы заключается в получении данных, способствующих разработке научно-обоснованных методов сохранения вида, редкого на территории региона, так как знание популяционной структуры, динамики локальных популяций и связи между ними, является необходимым для планирования и реализации эффективных мер по охране.

Апробация работы. Результаты исследования представлены в виде устных и стендовых докладов на Европейской герпетологическом конгрессе 2011 (Люксембург, 2011), Международной студенческой конференции по природоохранной биологии (Великобритания, Кембридж, 2011), Пятом Азиатском герпетологическом конгрессе (Китай, Чэнду, 2012), Пятом съезде Герпетологического общества им. Никольского (Беларусь, Минск, 2012), а также на межлабораторном семинаре Института Фармации и Молекулярной Биотехнологии Хайдельбергского Университета (Германия) и на межлабораторном семинаре ИСиЭЖ СО РАН.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 научных работ, в том числе 6 статей в изданиях, рекомендованных ВАК для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 117 страницах машинописного текста; состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов и списка литературы. Работа иллюстрирована 17 рисунками и 24 таблицами. Список литературы включает 200 работ, из которых 139 на иностранном языке.

Благодарности. Работа выполнена под руководством д.б.н. Ю.Н. Литвинова, которому автор выражает искреннюю благодарность за поддержку на всех этапах работы, к.б.н., доценту Ермакову О.А. (Пензенский ГУ) за научное консультирование в области филои популяционной генетики. Автор благодарит д.б.н., проф. Ю.С. Равкина, к.б.н. Е.И. Зуйкову, к.б.н. Семенова Г.А. за ценные замечания, сделанные при работе с рукописью; к.б.н. В.К. Зинченко, И.С. Долгова, А.П. Симонова, Д.Р. Хайдарова за помощь в полевых исследованиях и сборе материала. Особую признательность хотелось бы выразить проф. М. Винку (Хайдельбергский Университет, Германия) за предоставленную возможность проведения части лабораторных исследований на базе Института фармации и молекулярной биотехнологии и обсуждение результатов. Отдельная благодарность супруге автора Д.В. Симоновой за проявленное понимание и поддержку.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. ПЕРИФЕРИЙНЫЕ ПОПУЛЯЦИИ ОБЫКНОВЕННОГО ЩИТОМОРДНИКА (*GLOYDIUS HALYS*) КАК МОДЕЛЬНЫЙ ОБЪЕКТ ПОПУЛЯЦИОННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В первой части главы 1 в ретроспективе рассмотрены современные представления о внутренней структуре и динамике популяций животных. Во второй части дана всесторонняя характеристика изучаемого вида – обыкновенного или Палласова щитомордника *Gloydius halys* (Pallas, 1776), освещены вопросы таксономии, распространения, популяционной экологии и репродуктивной биологии. В третьей части обзора проведен анализ работ, посвященных исследованиям популяционной биологии змей. Особое внимание уделено характеристикам данной группы животных, которые необходимо учитывать при проведении подобных исследований.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Физико-географическая характеристика района исследований

Полевые исследования в 2007-2011 гг. осуществлялись на территории Маслянинского и Искитимского административных районов Новосибирской области, в долине среднего течения реки Бердь. В данном районе река Бердь пересекает северо-западные отроги Салаирского кряжа, которое представляет собой холмистое, увалистое низкогорье с высотами 400-450 м над уровнем моря. В местах выхода стойких к разрушению пород образуются останцы, уступы и скалы, что особенно характерно для данного участка реки.

2.2. Картирование пространственной структуры местообитаний

В ходе полевых работ при помощи портативного навигатора (GPS) была произведена географическая привязка точек, соответствующих занимаемым щитомордником биотопам. С использованием программы ArcView 3.2 космические снимки были дешифрированы, используя метод комбинирования визуального и автоматизированного дешифрования с "обучением". В программе MapInfo 9.5 выделенные участки скальных местообитаний были наложены на топографическую карту местности, с последующим определением их площади.

2.3. Методы изучения морфологической изменчивости

Для детального изучения были выбраны три локальные популяции (рис. 1). Всего было измерено 226 особей обыкновенного щитомордника. В качестве изучаемых признаков использовались традиционные метрические и меристические показатели, позволяющие сопоставлять полученные результаты с данными других авторов. Всего проанализировано 9 меристических признаков, 3 метрических и 2 индекса. Билатеральные признаки, ввиду их склонности к проявлению асимметрии, учитывались с обеих сторон. Для каждого признака определялось его среднее значение (*M*), ошибка среднего (*m*), среднее квадратичное отклонение (*SD*), коэффициент вариации (CV). Проверка нормальности распределения переменных осуществлялась при помощи теста Колмогорова-Смирнова, однородность дисперсий проверялась при помощи теста Левена. Для определения достоверности отличий между группами использовался параметрический *t*-критерий Стьюдента или непараметрический *U*-критерий Манна-Уитни (Mann-Whitney *U* Test). С целью выяснения значимости различий средних между нашими и литературными данными применялась модификация *t*-критерия допускающая неравенство дисперсий между выборками. Для всех статистических тестов был установлен уровень значимости 0,05. Статистические расчёты были выполнены с использованием электронных таблиц Excel и пакета статистических программ Statistica for Windows 6.0.

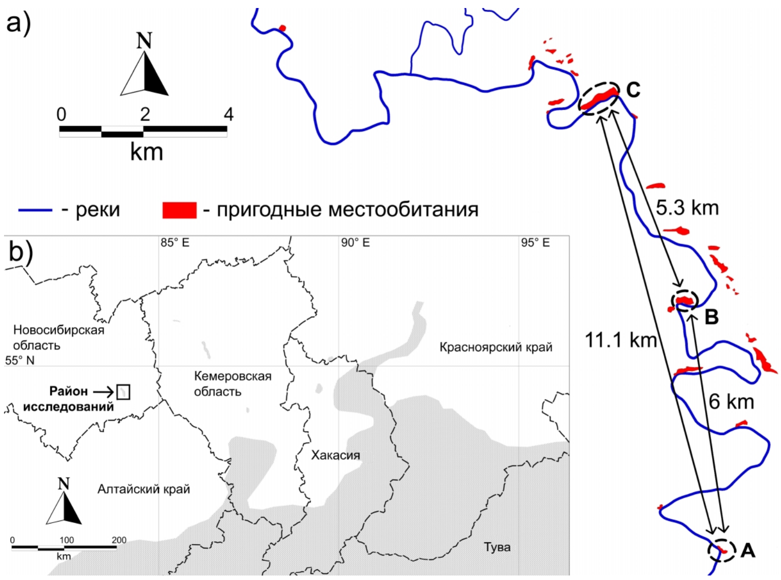

Рис. 1. Локальные популяции выбранные для исследования (a) и положение изучаемой популяции относительно ареала *G. halys* (b).

2.4. Методы изучения экологии и демографических параметров

Активность змей определялась посредством визуальных учётов на трансектах с нефиксированной шириной. Для анализа ассоциаций между возрастными группами щитомордников (взрослые и новорожденные) и учитываемыми переменными (тип местообитания, экспозиция, время) был использован простой и множественный анализ соответствий [Greenacre, 1984].

Для оценки абсолютной численности локальных популяций был использован метод мечения и повторных отловов. Присвоение индивидуальных меток осуществлялось путём подрезания брюшных щитков [Brown, Parker, 1976]. Мечение и повторные отловы проводились в 2009, 2010 и 2011 годах. Метод Шнабеля [Schnabel, 1938] применялся для расчетов абсолютной численности внутри одного года. Данный метод предполагает незначительный приток новых особей в популяцию между периодами мечения и отловов (т.е. используется модель «закрытой» популяции). При анализе данных собранных за три года использовались метод трехкратных отловов Бейли [Bailey, 1951; 1952; Коли, 1979] и метод Джолли-Зебера [Jolly, 1965; 1982; Seber, 1965; Коли, 1979]. Данные методы пригодны для исследования «открытых» популяций, то есть когда между периодами мечения и отловов происходит приток или убыль особей за счет миграции, рождаемости и смертности. Для расчетов использовались электронные таблицы Excel (метод Шнабеля и метод Джолли-Зебера) и оригинальный скрипт написанный в программной среде Python 3.2 (метод трехкратных отловов Бейли).

2.5. Изучение структуры и динамики популяции при помощи молекулярно-генетических методов

В качестве образцов тканей для выделения ДНК использованы мазки со слизистого эпителия ротовой полости, фрагменты брюшных щитков и кончики хвостов. Кроме того, были использованы ткани от экземпляров обыкновенного щитомордника, находящихся в коллекции Института систематики и экологии, животных СО РАН. Выделение ДНК осуществляли по стандартной методике фенол-хлороформной экстракции с предварительной обработкой протеиназной К и SDS [Sambrook et al., 1989].

Для реконструкции филогении и определения разнообразия митохондриальных гаплотипов в исследуемой популяции определяли нуклеотидную последовательность фрагмента митохондриального гена НАДН-дегидрогеназы-4 (ND4) длинной 708 пар нуклеотидов (пн), используя праймеры ND4 и tRNA-leu [Arevalo, Davis and Sites, 1994]. Секвенирование проводили на автоматическом секвенаторе ABI 3730 (Applied Biosystems) с применением набора ABI Prism Big Dye Terminator 3.1. Для реконструкции филогенетических отношений использовались метод максимального правдоподобия (ML) [программа MEGA 5.05; Tamura et al., 2011] и Байесовский анализ [программа MrBayes 3.1.2; Huelsenbeck and Ronquist, 2001]. Дивергенция между отдельными гаплотипами/гаплогруппами оценивалась при помощи *p*-дистанций в программе MEGA 5.05.

Восемь микросателлитных локусов было использовано для изучения внутрипопуляционной генетической структуры. Данные маркеры анализировались при помощи высокоразрешающего электрофореза в 6% денатурирующем полиакриламидном геле, используя Base Acer Sequencer (Stratagene). Результаты амплификации визуализировались при помощи радиоавтографии.

Все микросателлитные локусы были проверены на возможные ошибки генотипирования с использованием программы Micro-Checker 2.2.3 [Oosterhout et al., 2004]. Тесты на отклонения от равновесия Харди-Вайнберга и отсутствие неравновесного сцепления генов были выполнены в программе Genepop web version 4.0.10 [Rousset, 2008]. Коррекцию уровней статистической значимости для множественных сравнений проводили с помощью процедуры Benjamini and Yekutieli (B–Y) [Benjamini and Yekutieli, 2001]. Для вычисления коэффициента инбридинга (F_{IS}) в каждой выборке и аллельного разнообразия (A_R) скорректированного на минимальный размер выборки была использована программа Fstat 2.9 [Goudet, 1995]. Вычисление наблюдаемой (H_O) и ожидаемой (H_E) гетерозиготности проводили в программе Arlequin 3.5 [Excoffier and Lischer, 2010]. Различия в наблюдаемой гетерозиготности, количестве аллелей на локус и аллельном разнообразии были оценены при помощи теста Фридмана используя статистический пакет PASW Statistics 18.0.

Для оценки генетической структуры популяции рассчитывались следующие показатели. А именно: несмещенная оценка генетической дифференцияации F_{ST} (θ) [Weir and Cockerham, 1984] для всех локусов вычислялась в программе Fstat; среднее θ_{Fst} и 99% доверительный интервал получали при помощи ресемплинга; парные значения F_{ST} и линеаризованные F_{ST} дистанции Сталкина вычислялись в программе Arlequin и проверялись на статистическую значимость, используя 10 000 пермутаций. Чтобы определить относительную силу генетического дрейфа в каждой из выборок, рассчитывали локальное значение

F_{ST} [local population F_{ST}; Gaggiotti and Foll, 2010] и 95% интервалы наивысшей плотности апостериорного распределения (HPDI) используя программу GESTE 2.0 [Foll and Gaggiotti, 2006]. Программа GeneClass2 2.0 [Piry et al., 2004] использовалась для анализа популяционной структуры с применением Байесовской статистики. Суть данного метода заключается в вычислении вероятности (на основе данных генотипов) с которой особь относится к тому или иному кластеру (выборке).

Для теста на недавнее сокращение размера популяции (прохождение через «горлышко бутылки») была использована программа Bottleneck 1.2 [Piry, Luikart and Cornuet, 1999]. Первый из использованных подходов основан на тестировании гипотезы об избытке наблюдаемой гетерозиготности (H_O). Согласно количеству использованных локусов и рекомендациям авторов программы, для поверки статистической значимости гипотезы был выбран тест Уилкоксона. Второй из подходов основан на распределении частот редких и частых аллелей. Популяции находящиеся в равновесии и не испытывавшие резкого снижения численности в недавнем прошлом должны иметь L-образное распределение частот аллелей [Luikart et al., 1998]. При резком сокращении эффективного размера популяция будет быстрее терять низкочастотные аллели, что вызовет нарушение L-образного распределения.

Долговременный тренд изменения численности популяции оценивался при помощи Байесовского подхода основанного на теории коалесценции и реализованного в программе MSVAR 0.4.1 [Beaumout, 1999]. Данная программа использует MCMC (Markov chain Monte Carlo) симуляции для получения апостериорных вероятностей распределения $\log_{10}(r)$, $\log_{10}(tf)$ и $\log_{10}(\Theta)$. Первый параметр, r (уровень популяционного изменения), представляет собой отношение текущего эффективного размера популяции (N_0) к эффективному размеру популяции до начала сокращения или увеличения численности (N_1). Для каждого параметра определяли медиану и 95% HPDI. Данный вид анализа проводился на всей популяции одновременно (n = 157).

Для оценки потока генов (m) между локальными популяциями использовали программу BAYESASS, Version 1.3 [Wilson and Rannala 2003]. BAYESASS оценивает скорости миграции за несколько последних поколений используя метод MCMC, при этом алгоритм программы не требует допущения о том что в популяциях существует равновесие между миграцией и дрейфом или равновесие Харди-

Вайнберга. Для оценки долговременного потока генов ($M = m/(m \times \mu)$, где m = скорость миграции и μ = скорость мутаций) между локальными популяциями и теты ($\Theta = 4N_e\mu$; где N_e = эффективный размер популяции) использовалась программа MIGRATE v. 3.2.7 [Beerli and Felsenstein 1999, 2001], которая позволяет оценить скорость миграции и эффективный размер популяции на основе теории коалесценции и метода MCMC.

Глава 3. ПОЛОЖЕНИЕ ИССЛЕДУЕМОЙ ПОПУЛЯЦИИ ВНУТРИ КОМПЛЕКСА *GLOYDIUS HALYS-G. INTERMEDIUS*

3.1. Общие замечания к главе 3

Систематика и таксономия комплекса видов *G. halys* – *G. intermedius* является одной из наиболее сложных и запутанных проблем в систематике змей [Gloyd and Conant, 1990]. Изучение филогенетических взаимоотношений внутри данной группы не являлось специальной задачей данного исследования. Тем не менее, установление филогенетического контекста, то есть положения исследуемой популяции относительно других представителей (популяций) данного вида, является важным условием для понимания и интерпретации полученных нами данных, а также возможности их интерполяции на другие популяции вида.

3.2. Изменчивость митохондриальной ДНК и филогенетический анализ

Изменчивость мтДНК внутри Новосибирской популяции. Были получены последовательности гена ND4 для 30 особей *G. halys* из Новосибирской области (по 10 из каждой локальной популяции). Все щитомордники имели идентичный гаплотип H1, за исключением одной особи из локальной популяции A, имевшей гаплотип H2. Обнаруженные гаплотипы отличаются только одной синонимичной заменой.

Доминирование одного митохондриального гаплотипа H1 с частотой 96,7% подтверждает относительно недавнее и общее происхождение локальных популяций. Сходный характер изменчивости мтДНК характерен для ряда популяций рептилий Палеарктики [например, *Natrix tessellata*, *Lacerta viridis*; Joger et al., 2007; Joger et al., 2010]. Эти виды пережили существенное расширение ареалов после окончания последнего крупного оледенения, достигнув максимального распространения во время Голоценового климатического оптимума [Joger et al., 2010]. С окончанием Голоценового климатического оптимума ареалы этих видов претерпели некоторое сокращение. Их небольшие изолированные популяции сохранились в климатически благоприятных районах к северу от основного ареала, преимущественно по южным склонам речных долин [Joger et al., 2010].

Подобно видам, упомянутым выше, щитомордник имеет очень разрозненное распространение вдоль северной границы ареала на юге Сибири и занимает местообитания с подходящими микроклиматическими условиями (южные склоны с горно-степной растительностью) вдоль речных долин. Таким образом, изучаемая популяция обыкновенного щитомордника вероятнее всего, представляет собой голоценовый реликт, и сформировалась около 5 000 лет назад из-за сокращения ареала вида после Голоценового климатического оптимума [Quante, 2010]. Данную гипотезу поддерживают результаты коалесцентной симуляции динамики эффективного размера популяции в долгосрочной ретроспективе.

Положение исследуемой популяции внутри комплекса G. halys – G. intermedius. На рисунке 2 представлено филогенетическое дерево, построенное при помощи Байесовского анализа. Генетические дистанции между отдельными филогенетическими линиями варьируют от 1,1 до 4,7%. На юге Западной Сибири обыкновенный щитомордник представлен двумя формами как минимум подвидового ранга (дистанция по мтДНК составляет 3,5%). *G. halys* ssp. 1 распро-

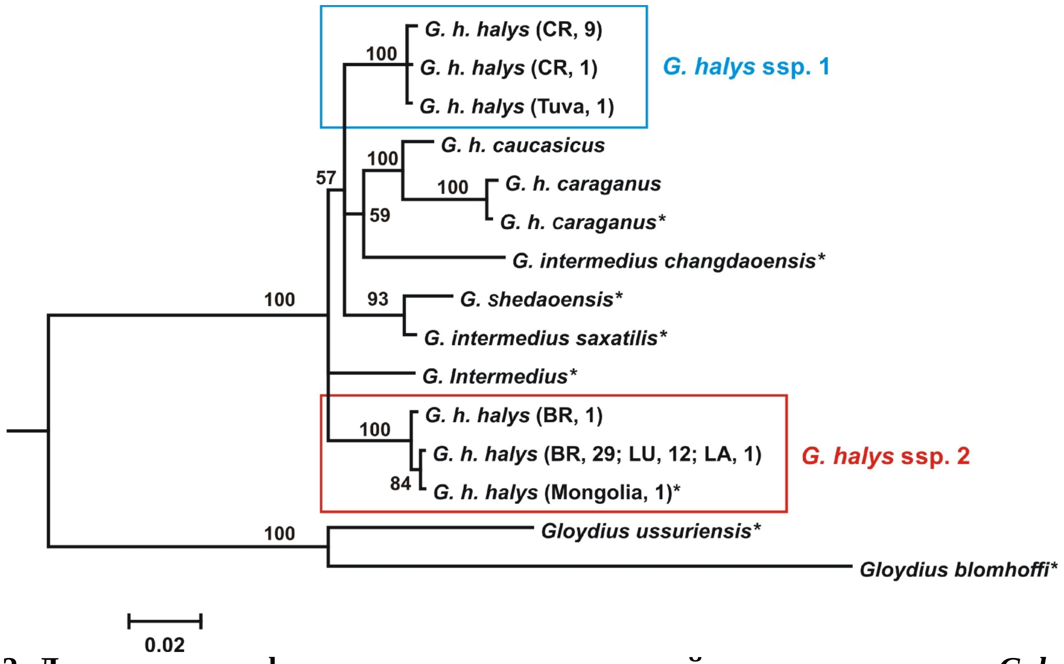

Рис. 2. Дендрограмма филогенетических отношений внутри комплекса *G. halys – G. intermedius* основанная на неполных последовательностях митохондриального гена ND4 (708 пн), построенная при помощи Байесовского анализа. Указаны апостериорные вероятности больше 50%. В скобках указанны аббревиатуры популяций и количество особей имеющих данный гаплотип. *последовательности полученные из GenBank.

странен на Алтае и юге Республики Тыва, тогда как *G. halys* ssp. 2 обитает в Новосибирской области, Алтайском крае, на границе Красноярского края и Хакасии (оз. Учум) и доходит до Восточной Монголии. По всей видимости, эта же форма щитомордника обитает на территории Кемеровской области, Прибайкалье и Забайкалье. Вопрос о том, какую из этих двух форм считать номинативной, остается открытым, так как отсутствуют образцы с типовой территории вида (район Минусинской котловины, Хакасия).

3.3. Морфологическая изменчивость внутри вида

Как самцы, так и самки щитомордников из Новосибирской области обладают достоверно меньшим количество брюшных (*Ventr.*) и подхвостовых (*Scd.*) щитков по сравнению со змеями из Западной Монголии (представляющих, вероятно, *G. halys* ssp. 1). Щитомордники из Восточной Монголии, относящиеся, вероятно к той же группе, что и Новосибирская популяция – *G. halys* ssp. 2, отличаются достоверно меньшим количеством брюшных щитков у самок и подхвостовых щитков у самцов. При этом степень отличий выше при сравнении со щитомордниками из Западной Монголии. Таким образом, морфологические данные согласуются с генетическими и подтверждают сходство Новосибирской популяции с Восточно-Монгольской и их отличия от щитомордников из Западной Монголии.

Глава 4. СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИИ

4.1. Биотопическая приуроченность, характеристика и пространственная структура местообитаний

На изучаемой территории щитомордник придерживается каменистых и скальных местообитаний, представленных каменными осыпями, обнаженными скалами, нагромождениям крупных камней и валунов, а так же каменистой степи. Общая площадь пригодных местообитаний в регионе составляет около 120 га. В данном разделе, кроме того, рассмотрены особенности суточной активности и биотопической приуроченности разных возрастных групп щитомордника. Показана приуроченность новорожденных щитомордников к участкам каменистой степи.

4.2. Морфологическая изменчивость внутри популяции

Значимые отличия между локальными популяциями выявлены по пяти признакам. Самцы из локальной популяции В отличаются большими значениями количества брюшных щитков (ANOVA: F =

6,002; p = 0,004), отношением количества брюшных щитков к подхвостовым (ANOVA: F = 3,431; p = 0,038) и длины туловища к длине хвоста (Kruskal-Wallis ANOVA: H = 13,160; p = 0,001). Змеи из локальной популяции A отличаются меньшим количеством височных щитков в первом и во втором ряду (Kruskal-Wallis ANOVA: H = 9,658; p = 0,008 и H = 8,839; p = 0,012, соответственно). Будучи количественными по своей природе, данные признаки, вероятнее всего, являются полигенными, и их различия могут носить случайный характер, отражая эффект генетического дрейфа. Кроме того, в случае самцов из локальной популяции B, изменения признаков, проявляющих половой диморфизм в сторону его усиления, могут быть связаны с более острой конкуренцией в данной локальной популяции вследствие большей плотности змей.

4.3. Возрастной и половой состав популяции

Доля самцов достоверно ниже в локальной популяции A, тогда как в других локальных популяциях достоверных отличий не обнаружено. Тем не менее, во все трех выборках соотношение самцов и самок составляет около 2:3. Кроме того, данная пропорция является достоверной и при объединении данных по всем локальным популяциям. Среди половозрелых особей во всех трех локальных популяциях преобладают змеи с длиной туловища 500-600 мм, что примерно соответствует возрасту в 4-5 лет (по Колобаеву Н.Н., неопубликованные данные). Значимых отличий по этому показателю между локальными популяциями не обнаружено (Kruskal-Wallis ANOVA: H = 3,662, p = 0,160).

4.4. Генетическое разнообразие и структура популяции

Значения средней наблюдаемой гетерозиготности (H_O) и средней ожидаемой гетерозиготности (H_E) оказались высокими и практически идентичными во всех трех локальных популяциях (H_O, тест Фридамана: χ^2 (2) = 0,250, P = 0,882). Среднее аллельное разнообразие, скорректированное на минимальный размер выборки было также схожим (A_R: χ^2 (2) = 4,065, P = 0,131), но абсолютное значение несколько выше в локальной популяции B (8,82). Кроме того, локальная популяция B, расположенная в центре исследуемой территории, имеет в три раза больше приватных аллелей (10) чем в расположенных по краям локальных популяциях A и C (по 3 аллеля). Однако проверка не выявила наличие статистически значимых различий (χ^2 (2) = 4,667, P = 0,097) между ними (Табл. 1).

Таблица 1.

Генетическая изменчивость локальных популяций обыкновенного щитомордника оцененная по 8 микросателлитным локусам.

Локальная популяция	n	$H_O \pm SD$	$H_E \pm SD$	N_A	A	A_P	A_R	F_{IS}	r
A	55	0,78 ± 0,10	0,76 ± 0,09	69	8,63	3	8,07	-0,021	0,118
B	58	0,75 ± 0,15	0,77 ± 0,13	78	9,88	10	8,82	0,029	0,110
C	44	0,74 ± 0,13	0,75 ± 0,14	68	8,75	3	8,38	0,015	0,125

n – размер выборки; H_O – средняя наблюдаемая гетерозиготность; H_E – средняя ожидаемая гетерозиготность; N_A – общее количество наблюдаемых аллелей; A – среднее количество аллелей на локус; A_P – количество приватных аллелей; A_R – среднее аллельное разнообразие скорректированное на минимальный размер выборки; F_{IS} – средний уровень инбридинга (дефицит гетерозиготности); r – среднее индивидуальное попарное родство [Wang 2007].

Общее значение F_{ST} является достоверным (θ_{Fst} = 0,013, 99% CI: 0,007-0,023), означая, что 1,3% генетической изменчивости связано с различиями между локальными популяциями. Все парные значения F_{ST} были статистически значимыми после B-Y коррекции для множественных сравнений и варьировали от 0,009 между B и C до 0,020 между A и C (рис. 3). Локальные значения F_{ST}, оцененные при помощи GESTE, различаются между выборками в соответствии с удаленностью каждой из них от центра популяции (Табл. 2). Локальная популяция A, расположенная на самом краю занимаемой щитомордником территории, является наиболее дифференцированной от общего генетического пула, то есть подвержена наибольшему воздействию генетического дрейфа.

Таблица 2.

Локальные значения F_{ST} в трех локальных популяциях щитомордника обыкновенного.

Локальная популяция	F_{ST}	
	Мода	95% HPDI
A	0,025	0,014 - 0,042
B	0,005	14×10^{-11} - 0,013
C	0,011	0,002 - 0,023

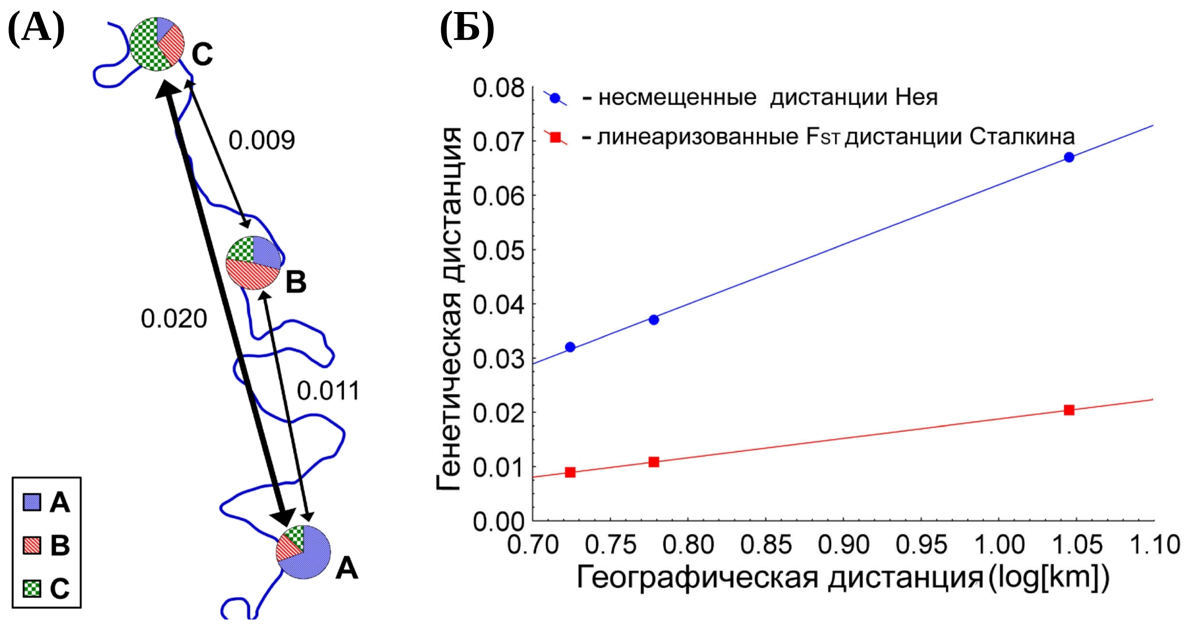

Рис. 3. (А) Генетическая дифференциация между локальными популяциями обыкновенного щитомордника. Толщина стрелок отражает относительную величину парных F_{ST} значений. Круговые диаграммы отражают долю особей отнесенных к той или иной локальной популяций по результатам Байесовского анализа. (Б) Диаграмма рассеивания, показывающая связь между генетическими дистанциями и log-трансформированными географическими дистанциями.

Глава 5. ДЕМОГРАФИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ПОПУЛЯЦИИ

5.1. Численность по результатам мечения и повторных отловов

В 2009-2011 гг. было поймано и помечено 198 змей, из них 16 (8,1%) было отловлено повторно. Все особи, отловленные повторно, были обнаружены в местах их первоначального мечения, то есть за три года исследований нам не удалось документально зафиксировать перемещения змей между популяциями. Результаты оценки абсолютной численности при помощи разных методов приведены в Табл. 3. При помощи метода Джолли-Зебера и метода трехкратных отловов Бейли были получены сходные оценки численности локальных популяций, используя данные за три года. В тоже время, расчеты, основанные на отловах в течение одного сезона активности змей, отличаются значительно (Табл. 3). В данной ситуации мы склонны придерживаться результатов, основанных на трёхгодичных данных с использованием методов, предусматривающих модель «открытой» популяции. Оценки численности, полученные на основе внутрисезонных отловов, выглядят несостоятельными. Например, в локальной популяции В за три года было поймано 83 щитомордника, при этом удавалось отлавливать лишь около 20-30% увиденных змей. Тогда как абсолютная численность согласно разным методам на основе внутрисезонных данных составила 80-228 особей, что явно меньше наблюдаемого нами количества особей.

Таблица 3.

Абсолютная численность локальных популяций щитомордника обыкновенного по результатам мечения и повторных отловов.

Локальная популяция	Метод измерения, численность [особей]						
	Между годами			Внутри года			
	J-S	B	среднее	B	J-S	S	среднее
A	676	650	663	120	176	79	125
B	1369	1332	1351	80	85	228	131
C	1024	992	1008	86	90	116	97

Сокращения: J-S – метод Джолли-Зебера; B - метод трехкратных отловов Бейли; S - метод Шнабеля.

5.2. Оценка численности по генетическим данным

Для оценки численности популяции может быть использован эффективный размер популяции (N_e), который отражает только численность размножающихся особей и может быть выведен из генетических данных через параметр тета ($\Theta = 4N_e\mu$; где μ = скорость мутации). Наименьшая численность установлена для локальной популяции А (1639 особей), наибольшая - для локальной популяции В (2033 особи). Несмотря на разницу в 1,5 - 2,5 раза, данные оценки численности можно считать приближенными к значениям, полученным при помощи мечения и повторных отловов (на основании трехгодичных данных) с учетом высокой вероятности недооценки численности последними. Кроме того, оба подхода дают скоррелированные оценки численности, сходным образом ранжируя локальные популяции по этому показателю (рис. 4А).

5.3. Динамика размера популяции в краткосрочной и долгосрочной ретроспективе

С использованием теста на избыточную гетерозиготность не было выявлено никаких признаков прохождения локальных популяций через «горлышко бутылки». Кроме того, не было выявлено дефицита редких аллелей, то есть распределение частот аллей в локальных популяциях является L-образным (рис. 4Б).

В долговременной ретроспективе выявлено существенное сокращение численности всей популяции. Согласно результатам программы MSVAR современный размер популяции составляет 0,4% (0,1-1,41%) от её «исторического» размера и популяция начала сокращаться в размере 16,6 N_0 (5,01-57,54 N_0) поколений назад. Выявленная динамика изменения размера популяции поддерживает гипо-

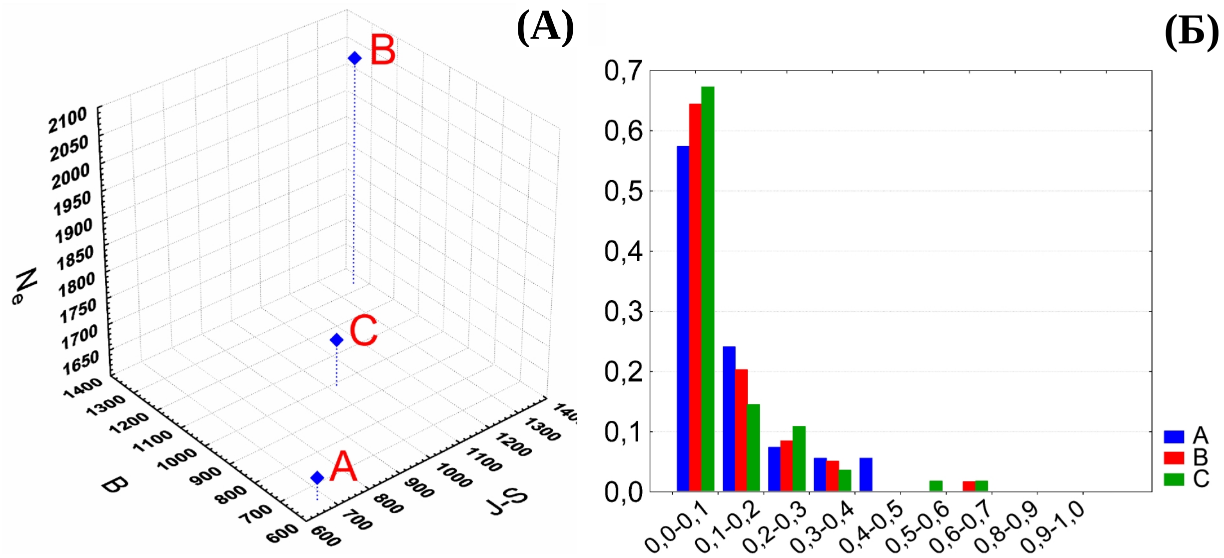

Рис. 4. (А) XYZ диаграмма рассеяния оценки численности локальных популяций *G. halys* разными методами (J-S - метод Джолли-Зебера; B - метод трехкратных отловов Бейли; N_e – эффективный размер популяции на основе генетических данных). (Б) Распределение частот аллелей микросателлитных локусов в локальных популяциях *G. halys* рассчитанное с помощью программы BOTTLENECK. По оси ординат – пропорции аллелей, по оси абсцисс – частоты аллелей.

тезу о том, что изучаемая популяция представляет собой относительно недавний реликт, возникший вследствие сокращения ареала вида после Голоценового климатического оптимума.

5.4. Миграция особей внутри популяции

Статистически значимые различия ($p < 0,05$) между самцами и самками были выявлены по F_{ST} и R (коэффициент родства). Гораздо более низкие показатели генетической дифференциации между локальными популяциями и среднего уровня родства у самцов свидетельствуют об их существенно большей склонности к расселению.

При анализе самцов и самок вместе, кратковременные оценки миграции колебались от 0,0072 (из С в А) до 0,1875 (из А в В) (Табл. 4). При этом не было обнаружено достоверных отличий в уровне миграции в любой из пар локальных популяций. При использовании в анализе только самцов были получены отличающиеся оценки уровней миграции (Табл. 4). При этом ассиметричные уровни миграции (то есть, неперекрывающиеся 95% доверительные интервалы) были получены для пары локальных популяций А и В. Поток генов из локальной популяции В в локальную популяцию А более чем в 4,5 раз превышает таковой в обратном направлении (Табл. 4).

Таблица 4.

Оценки направленного потока генов (m) в каждой паре локальных популяций обыкновенного щитомордника для общей выборки (самцы и самки) и только для самцов.

Пара	m (95% CI)	
	самцы + самки	самцы
A→B	0,1875 (0,0009 – 0,3260)	0,0540 (0,0005 – 0,0997)
A→C	0,1820 (0,0118 – 0,3263)	0,0511 (0,0007 – 0,0936)
B→A	0,1262 (0,0002 – 0,3301)	0,2593 (0,2318 – 0,3289)
B→C	0,1327 (0,0014 – 0,3151)	0,2537 (0,1767 – 0,3274)
C→A	0,0072 (0,0001 – 0,0293)	0,0171 (0,0004 – 0,0595)
C→B	0,0430 (0,0021 – 0,1143)	0,0748 (0,0016 – 0,1992)

Локальная популяция C, расположенная ниже по течению реки, имеет наибольшее значение чистой эмиграции (совокупная эмиграция в популяцию минус совокупная иммиграция из популяции) как при расчетах, включающих одновременно самцов и самок, так и только самцов (Табл. 5). Самая крупная из локальных популяций – B, обладает негативным уровнем чистой эмиграции, и служит основным источником мигрантов в другие локальные популяции.

Таблица 5.

Сводные данные по уровням эмиграции, иммиграции и чистой эмиграций между локальными популяциями обыкновенного щитомордника.

Локальная популяция	Совокупная эмиграция	Совокупная иммиграция	Чистая эмиграция
	самцы + самки		
A	0,1334	0,3695	−0,2361
B	0,2305	0,2589	−0,0284
C	0,3147	0,0502	+0,2645
	только самцы		
A	0,2764	0,1051	+0,1713
B	0,1288	0,5130	−0,3842
C	0,3048	0,0919	+0,2129

Заключение

Существование видов в виде изолированных популяций на периферии ареала связано, как правило, с отдельными участками местообитаний, предоставляющих благоприятные микроклиматические условия при в целом неоптимальном наборе абиотических и биотических факторов. В таких условиях происходит формирование небольших по размерам и численности локальных популяций, что особенно характерно для пресмыкающихся ввиду особенностей их экологии как пойкилотермных организмов. В таких условиях жизнеспособность локальных популяций становится в зависимость от характера взаимодействия между ними. Большое количество локальных популяций, имеющих собственную демографическую динамику, но при этом связанных между собой посредством определенного уровня миграции особей (= потока генов), имеют больше шансов для выживания в долгосрочной перспективе [Gaggiotti and Hanski, 2004]. Миграция уравновешивает потенциально неблагоприятное воздействие генетического дрейфа на локальные популяции, способствует распространению выгодных аллелей и поддержанию гетерозиготности. С другой стороны, слишком интенсивный обмен мигрантами приводит к быстрому распространению паразитов и заболеваний между локальными популяциями, что иногда может иметь фатальные последствия для их выживания [Gaggiotti, 2003].

Нами была изучена структура и динамика изолированной популяции обыкновенного щитомордника на северной периферии ареала. С использованием экологических и генетических данных подтверждена относительная дискретность локальных популяций, приуроченных к подходящим участкам местообитаний. При этом между локальными популяциями сохраняется небольшой уровень обмена особями, в первую очередь за счет расселения самцов. Миграция при этом носит ассиметричный характер: источниками мигрантов служат большие по численности локальные популяции, расположенные в центре занимаемой видом территории. Так как нами было установлено, что локальные популяции, расположенные по краям данной территории, более подвержены воздействию генетического дрейфа, «эффект спасения» за счет притока новых особей (и новых аллелей) из центра популяции должен играть важную роль в поддержании их долговременной жизнеспособности и генетического разнообразия.

Наши данные указывают на благополучное состояние локальных популяций вида, поскольку они имеют относительно высокую численность, характерное для змей соотношения самцов и самок и возрастную структуру, высокое генетическое разнообразие. Для поддержания долговременной жизнеспособности всей популяции основное внимание стоит уделить мониторингу состояния крупных локальных популяций в центре занимаемой видом территории, и сохранению участков пригодных местообитаний на всем протяжении распространения, с целью поддержания потока мигрантов.

Выводы

1. На территории юга Западной Сибири обыкновенный щитомордник представлен двумя формами (*G. halys* ssp. 1 и *G. halys* ssp. 2), имеющих существенные генетические и морфологические отличия. Популяция с территории Новосибирской области относится к *G. halys* ssp. 2 и её изоляция связанна с сокращением ареала вида после Голоценового климатического оптимума (около 5000 лет назад).

2. Локальные популяции щитомордника в пределах Новосибирской популяции приурочены к скальным местообитаниям, предоставляющим благоприятные микроклиматические условия для вида, в связи с чем популяция имеет четкую пространственную подразделённость в соответствии с расположением местообитаний. При этом локальные популяции обладают сходными демографическими характеристиками и демонстрируют морфологические отличия по отдельным признакам, связанные, скорее всего, со случайными факторами.

3. Изученная популяция отличается высоким уровнем генетического разнообразия, и относительно низкой для гадюковых змей, но значимой генетической дифференциацией на уровне локальных популяций. При этом прослеживается тенденция к изоляции расстоянием и усиливающееся влияние генетического дрейфа на локальные популяции, расположенные с краю.

4. Локальные популяции связаны между собой посредством миграции особей, при этом основную роль в расселении играют самцы, тогда как самкам присуща более высокая степень филопатрии.

5. Основные пути миграции – из наибольшей по размеру локальной популяции, расположенной в центре, к краевым локальным популяциям выше и ниже по течению реки. Таким образом, крупные локальные популяции служат источником притока генов к более мелким краевым популяциям и поддерживают равновесие между миграцией и генетическим дрейфом, что необходимо для долговременного существования локальных популяций.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК:

1. Симонов Е.П. Распространение и некоторые аспекты экологии обыкновенного щитомордника (*Gloydius halys*) на севере ареала в Новосибирской области // Поволжский Экологический Журнал. 2007. № 1. С. 71-74.

2. Simonov E., Zinchenko V. Intensive infestation of Siberian pit-viper, *Gloydius halys halys* by the common snake mite, *Ophionyssus natricis* // North-Western Journal of Zoology. 2010. V. 6. № 1. P. 134-137.

3. Simonov, E.P. Unusual colour form of Siberian pit viper (*Gloydius h. halys*) from the northern edge of its area // Acta Herpetologica. 2010. V. 5. № 1. P. 87-89.

4. Simonov E., Wink M. Cross-amplification of microsatellite loci reveals multiple paternity in Halys pit viper (*Gloydius halys*) // Acta Herpetologica. 2011. V. 6. № 2. P. 289-295.

5. Симонов Е.П., Винк М. Использование буккальных мазков для получения образцов ДНК чешуйчатых пресмыкающихся (Squamata): сравнительный анализ методов // Зоологический журнал. 2012. Т. 91. № 11. С. 1415-1419.

6. Simonov E., Wink M. Population genetics of Halys pit viper (*Gloydius halys*) at the northern distribution limit in Siberia // Amphibia-Reptilia. 2012. V. 33. P. 273-283.

Прочие публикации:

7. Симонов Е.П. Уточнение северной границы ареала щитомордника обыкновенного (*Gloydius* (*Agkistrodon*) *halys*) и его биотопическая приуроченность на территории Западной Сибири // Вестник Мордов. ун-та. 2008. № 2. биол. науки. С. 65-70.

8. Симонов Е.П. Различия некоторых экологических показателей у двух возрастных групп в популяции щитомордника обыкновенного // Сообщества и популяции животных: экологический и морфологический анализ (коллективная монография). Изд. КМК. М.: 2010. С. 245-254.

9. Simonov E.P. Differences in habitat use, daily activity patterns and preferred ambient temperatures of adult and neonate *Gloydius halys halys* from an isolated population in southwest Siberia: preliminary data // Herpetology Notes. 2009. V. 2. P. 1-7.

10. Simonov E.P., Wink M. Fine scale genetic structure and male-biased dispersal in a metapopulation of Halys pit viper (*Gloydius halys*) // Abstracts of the SEH European Congress of Herpetology & DGHT Deutscher Herpetologentag. Luxembourg, 2011. P. 123.

11. Simonov E.P., Johnsen A. Unexpected phylogenetic relationships between populations of Halys pit-viper (*Gloydius halys*) in West Siberia // Proceedings of the 5th Asian Herpetological Conference. Chengdu, 2012. P. A075.